

Labelling Antibodi Anti-TPO Menggunakan Alkaline Phosphatase (AP) Untuk Deteksi Autoantibodi TPO Pada Serum Pasien *Autoimmune Thyroiditis Disease* (AITD) Menggunakan Dot-Blot

Hilman Nurmahdi, Aulanni'am*, Chanif Mahdi

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email : aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Penyakit autoimun tiroiditis (AITD) merupakan jenis kelainan autoimun organ spesifik yang banyak ditemukan di dunia. Adanya autoantibodi TPO dalam tubuh pasien, sering digunakan sebagai biomarker penyakit AITD. Pada penelitian ini dilakukan pelabelan antibodi terhadap autoantibodi TPO menggunakan *Alkaline Phosphatase* yang digunakan untuk deteksi serum pasien AITD menggunakan metode Dot Blot secara *direct*. Protein autoantibodi TPO diisolasi dari serum pasien positif AITD, mempunyai berat molekul 51,1 kDa dan telah dikonfirmasi dengan western blot menggunakan monoklonal antibodi TPO. Autoantibodi TPO digunakan sebagai antigen untuk memproduksi antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO pada hewan coba kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Hasil penelitian menunjukkan autoantibodi TPO bersifat imunogenik yang mampu memicu produksi antibodi terhadap autoantibodi TPO. Titer tertinggi antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO berdasarkan hasil *optical density* dengan teknik ELISA adalah sebesar 1,75. Hasil Antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO yang telah dilabel dengan *Alkaline Phosphatase* mampu mengenali autoantibodi TPO pada serum pasien AITD dengan teknik Dot Blot. Intensitas warna tertinggi terlihat pada *bleeding* ketiga.

Kata kunci : AITD, Alkaline Phosphatase, autoantibodi TPO, Dot Blot, ELISA

ABSTRACT

Autoimmune thyroiditis disease (AITD) is an organ specific autoimmune disorder which commonly found in the world. Presence of Thyroid Peroxidase (TPO) enzyme in AITD patient is often used as biomarker in AITD diseases. The aims of this research is done by labelling a polyclonal antibody against autoantibody TPO using Alkaline Phosphatase that used to detect autoantibody TPO in AITD patient using direct Dot Blot method. The protein of Autoantibody TPO is isolated from human AITD sera and has molecular weight of 51.1 kDa. This has been confirmed by western blot using monoclonal antibody standard for TPO. Autoantibody TPO is used as an antigen to produce polyclonal antibody against autoantibody TPO in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). The result of this research shown that autoantibody TPO is immunogenic that could stimulate immune system to produce polyclonal antibody against autoantibody TPO. The highest titer of polyclonal antibody against autoantibody TPO from rabbit sera has optical density of 1,75 using ELISA method. The result of Dot Blot showed that polyclonal antibody which labelled with Alkaline Phosphatase, is able to recognize autoantibody TPO in patient sera and have the highest colour intensity on the third bleeding.

Keywords : AITD, Alkaline Phosphatase, autoantibody TPO, Dot Blot, ELISA

PENDAHULUAN

Penyakit atau kelainan autoimun tiroiditis merupakan jenis kelainan autoimun organ spesifik yang banyak ditemukan di dunia. Penderita penyakit ini paling banyak ditemui pada wanita berusia 30-50 tahun [1]. Sebaran penyakit diketahui menjangkiti 2% sampai 4% pada wanita dan 1% pada pria. Data *American Cancer Society* (2011) menyatakan, tingkat

prevalensi sebaran penyakit autoimun adalah 0,5-10 jiwa per 100.000 populasi. Penyakit autoimun tiroiditis dapat memicu timbulnya banyak kelainan fungsi pada kelenjar tiroid, seperti penyakit *Graves Syndrome* dan *Hashimoto Thyroiditis*.

Pada penyakit AITD, autoantibodi TPO akan dikenali sebagai molekul non-*self*, hal ini akan membuat sistem imun menghasilkan antibodi yang bertujuan untuk mengurangi dan menghilangkan autoantigen tersebut dari dalam tubuh[2]. Adanya autoantibodi TPO dalam serum pasien berkorelasi dengan aktifitas autoimun tiroiditis kronis. Meskipun juga terdapat autoantibodi lain seperti anti-Tg dan anti-TSHR, namun anti-TPO lebih dapat merusak secara langsung sel-sel kelenjar tiroid [3].

Pada penelitian ini, autoantibodi TPO digunakan sebagai antigen, diperoleh dari serum darah pasien positif AITD, yang diimunisasikan pada hewan coba dengan tujuan diperoleh antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO. Antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO yang dihasilkan akan langsung dilabel menggunakan label enzim *Alkaline Phosphatase* dan kemudian akan berikatan dengan substrat sehingga dapat menghasilkan intensitas warna yang menunjukkan konfirmasi dan tingkatan konsentrasi dari adanya antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO pada titer dan metode *direct* Dot-Blot.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat sentrifugasi (Denley BR 401), vortex (Guo-Huq), Dot Blotter (BIORAD), seperangkat Alat Elektroforesis SDS-PAGE (BIORAD), Seperangkat alat western blot (BIORAD), membran nitrocellulosa (GE), ELISA reader, mikro pipet (10, 20, 200, 1000 μ L), tabung *polypropylene* (Falcon), pH meter digital (Inolab-WTW), kantong selofan.

Bahan yang digunakan Complete Freund's Adjuvan (Sigma-Aldrich), Incomplete Freund's Adjuvan (Sigma-Aldrich), Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich), Anti Rabbit IgG AP Conjugated, Tris-HCl (pH 6,8 0,02 M), buffer fosfat pH 7 (0,2 M), buffer fosfat pH 7 (0,1 M), Ethanol (Merck), Standard marker protein SDS-PAGE (Nacalai Tesque).

Pengumpulan dan Isolasi Protein Serum Darah Pasien AITD

Serum darah pasien penderita autoimun tiroiditis (AITD) diperoleh dari laboratorium SIMA, Malang, Indonesia secara acak dari semua umur penderita. Selanjutnya dilakukan isolasi protein dari serum darah pasien penderita AITD. Isolat protein kemudian

dilakukan purifikasi dan dilakukan identifikasi protein autoantibodi TPO menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE dan western blot. Dimana pada proses western blot ini digunakan alat transfer basah (wet) produksi BIORAD dan dilakukan transfer dari gel hasil elektroforesis menuju membran nitroselulosa selama 15 jam pada tegangan 25 V.

Isolasi Autoantibodi TPO dengan Elektroelusi

Hasil elektroforesis SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sesuai berat molekulnya dan dimasukkan dalam kantung selofan. Ditambahkan 1,5 ml larutan buffer fosfat 0,1 M pH7. Sebagai *running buffer* digunakan larutan buffer fosfat 0,05 M pH7. Proses elektroelusi dilakukan pada arus konstan 20 mA dan tegangan sebesar 250 V, selama 15 jam pada suhu 4°C. Hasil elektroelusi ditambah etanol dingin dengan perbandingan 1:1 (v/v) untuk presipitasi. Kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 10-15 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit. Endapan dipisahkan dan dilarutkan dalam larutan tris-HCl 20 mM pH 8 600 µl dan disimpan pada suhu -20°C.

Imunisasi Hewan Coba dengan Autoantibodi TPO dan Koleksi Serum Darah Kelinci

Ditambahkan adjuvan *Complete Freund's Adjuvan* (CFA) dengan perbandingan 1:1 (v/v) untuk imunisasi pertama dan dilakukan penambahan adjuvan *Incomplete Freund's Adjuvan* (IFA) sebagai *booster*. Antigen diinjeksikan pada hewan coba yang berupa kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan New Zealand White berumur 6 bulan. Penelitian ini dilaksanakan sesuai dengan prosedur laik etik dari komisi etik penelitian Universitas Brawijaya nomor 166-KEP-UB. Antigen diinjeksikan pada daerah subkutan daerah dorsal. Jadwal Imunisasi dan koleksi serum darah kelinci dapat dilihat pada tabel 1. Sampel darah kelinci diambil sebanyak 2-3ml pada pembuluh *vena auricularis* yang terletak di telinga luar dengan menggunakan suntik (*Disposable srynge OneMed 3ml*), dan diambil serumnya.

Tabel 1. Jadwal Imunisasi Kelinci dan Koleksi Serum

Minggu ke	Prosedur	Adjuvan
1	Imunisasi 1 Bleeding pre-imun	CFA
4	Imunisasi 2 (Booster 1)	IFA
5	Bleeding 1	-
6	Bleeding 2	-
7	Bleeding 3	-
8	Bleeding 4	-
9	Bleeding 5	-
10	Imunisasi 3(Booster 2)	IFA
11	Bleeding 6	-

Purifikasi IgG Antibodi Poliklonal Terhadap Autoantibodi TPO

Serum kemudian diambil sebanyak 200 µl dan ditambah larutan SAS (*saturated ammonium sulphate*) 50 % dengan perbandingan volume 1:1 (v/v) , dihomogenkan dengan

menggunakan vortex dan disimpan pada suhu 4⁰C selama 15 menit. Dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit. Endapan diambil dan ditambah dengan larutan SAS 50% sebanyak 10 kali volum endapan yang diperoleh. Dihomogenisasi dengan vortex, kemudian disimpan di lemari pendingin pada suhu 4⁰C selama 15 menit. Campuran dipisahkan menggunakan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan dilarutkan dalam 3 ml larutan buffer fosfat 0,2 M pH 8 dan dimasukkan ke dalam selofan untuk dilakukan dialisis dalam larutan buffer fosfat 0,1 M suhu 4⁰C selama 15 jam. Kemudian dipindahkan dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 (v/v). Disimpan pada suhu 4⁰C selama 24 jam. Dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit dan endapan diambil. Kemudian endapan dikeringanginkan dan dilarutkan dalam larutan tris-Cl 20 mM pH 6,8 dengan perbandingan volum 1:1 (v/v) dan disimpan pada suhu -20⁰C.

Penentuan Titer Tertinggi Antibodi Poliklonal Terhadap Autoantibodi TPO dengan Indirect ELISA

Metode yang digunakan adalah *indirect* ELISA, dimana yang pertama dilakukan adalah mengencerkan antigen dalam *Coating Buffer* (50µl/well) dan diinkubasi semalaman pada suhu 4⁰C. Kemudian antigen dicuci menggunakan larutan PBST selama 3x3 menit dan dilakukan blocking dengan *Blocking Buffer* (larutan BSA 1% dalam PBS) 50 µl/well. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 2 jam dan dicuci dengan larutan PBST selama 3x3 menit. Dilanjutkan *coating* antibodi primer anti-TPO sebanyak 50 µl/well dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang kemudian dicuci dengan larutan PBST selama 3x3 menit. Berikutnya, *coating* antibodi sekunder (1:2500) dalam larutan PBS. Dimana antibodi sekunder adalah *Anti Rabbit IgG AP Conjugated*. Antibodi sekunder diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang lalu dicuci dalam larutan PBST selama 3x3 menit. Ditambahkan substrat pNPP dalam dietanolamin 10% 50 µl/well dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang tanpa pencucian. Ditambahkan NaOH 3M 50µl/well sebagai stop reaction. Hasil kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.

Pelabelan Antibodi Poliklonal Terhadap Autoantibodi TPO Menggunakan Alkaline Phosphatase

Ditambahkan 3,0 mg/ml *Alkaline Phosphatase* dalam campuran antibodi IgG yang dilarutkan dalam larutan PBS. Ditambahkan glutaraldehid untuk memberikan konsentrasi final sebesar 0,2% (v/v) dan homogenasikan campuran tersebut selama 2 jam pada suhu ruang. Dilakukan dialisis menggunakan larutan TBS sebanyak 1 liter mengandung 1 mM

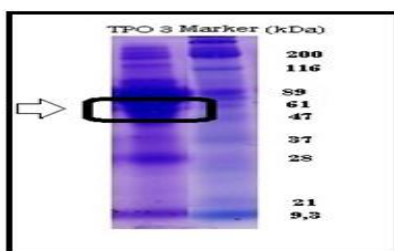
MgCl₂ pada suhu 4⁰C semalaman. Tambahkan pada campuran hasil dialisis dengan BSA, hingga 0,2 % volum. Simpan pada suhu 4⁰C.

Uji Spesifitas Antibodi Poliklonal Terhadap Autoantibodi TPO dengan Metode Dot-Blotting

Autoantibodi TPO diencerkan dengan PBS-Azida 1% kemudian ditetaskan di atas membran NC (*nitrocellulosa*) yang telah direndam pada larutan PBS dan dipasang pada alat Dot Blotter. Kemudian didegas selama 30 menit. dan dilakukan *blocking* dengan larutan PBS-Skim milk 5% selama 1 jam. Kemudian membran dicuci dengan larutan PBS-Tween20 selama 3x3 menit dan diinkubasi dengan antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO yang telah dilabel *Alkaline Phosphatase* selama 2 jam. Membran dicuci dengan larutan PBS-Tween20 selama 3x3 menit dan diinkubasi selama 30 menit menggunakan substrat *western blue* dalam kondisi gelap. Membran kemudian dikeringkan dan diamati blot yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil profil pita protein isolat autoantibodi TPO menggunakan metode SDS-PAGE (Gambar 1), diperoleh hasil berat molekul masing – masing protein dari isolat sebesar : 158,92 kDa, 131,54 kDa, 99,05 kDa, 81,99 kDa, 67,86kDa, 58,89kDa, 51,10 kDa, 42,30 kDa, 28,98 kDa, 17,23 kDa dan 11,26 kDa. Kemudian dilakukan konfirmasi menggunakan metode Western Blot (gambar 2), didapatkan hasil konfirmasi positif adanya autoantibodi TPO pada isolat protein serum dengan adanya warna biru keunguan pada membran *nitrocellulosa* dengan *range* berat molekul relatif sebesar 51,10 kDa.



Gambar 1. Profil Protein Autoantibodi TPO

Ket : Panah menunjuk pada pita protein TPO dengan berat molekul 51,1 kDa.

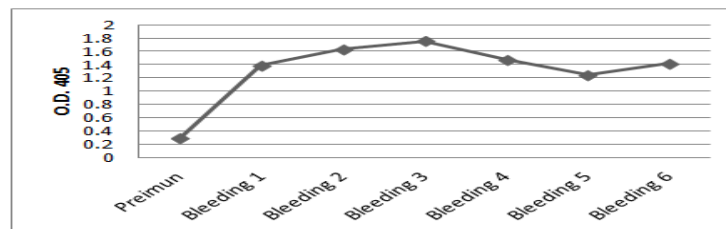


Gambar 2. Hasil Konfirmasi WesternBlot

Ket: Panah menunjuk pada pita 51,1 kDa yang dikenali sebagai autoantibodi TPO.

Selanjutnya, dilakukan proses elektroelusi untuk mengambil dan memurnikan protein autoantibodi TPO yang akan digunakan sebagai anatigen pada saat induksi hewan coba kelinci. Sistem imun dari kelinci akan mengenali sebagai antigen yang merangsang terbentuknya suatu respon imun berupa antibodi. Sel B akan berperan memproduksi suatu antibodi yang bersifat spesifik terhadap antigen dalam jumlah yang banyak (antibodi

poliklonal) yang mampu mengenali antigen tersebut [4]. Hasil antibodi poliklonal anti-TPO terlebih dahulu dipurifikasi sehingga didapatkan protein IgG yang terkandung dalam serum darah kelinci. Hasil purifikasi protein IgG dari serum darah kemudian diukur titer tertinggiya menggunakan ELISA (Gambar 3).



Gambar 3. Penentuan Titer Tertinggi Menggunakan ELISA

Dari gambar diatas dapat diketahui pula bahwa setelah dilakukan induksi antigen autoantibodi-TPO, terjadi peningkatan produksi antibodi poliklonal yang dihasilkan. Pada hasil *bleeding* 1 setelah dilakukan *booster* pertama, terjadi peningkatan absorbansi dibandingkan dengan pre-imun disebabkan karena sistem imun kelinci memproduksi antibodi sebagai respon imun primer tubuh untuk melawan adanya antigen yang masuk saat pertama kali terpapar antigen [5]. Disini, sistem imun primer akan mengaktivasi sel B *native* dalam tubuh kelinci untuk mengenali dan merespon antigen yang masuk ke dalam tubuh dan mebuat antibodi. Dari grafik, terjadi kenaikan nilai absorbansi dan merupakan titer tertinggi yaitu sebesar 1,75. Dimana kemudian diikuti dengan penurunan absorbansi titer akibat terjadi pengurangan jumlah produksi antibodi karena jumlah konsentrasi antigen yang menurun.

Hasil purifikasi IgG yang diperoleh dari serum selanjutnya diberi label menggunakan enzim *Alkaline Phosphatase*. Proses pelabelan ini menggunakan penambahan reagen glutaraldehyd, dimana berperan sebagai *homobifunctional reagent* untuk membentuk coupling antara molekul antibodi dengan label. Selanjutnya akan diuji secara kualitatif menggunakan metode *direct dot blot*. Dimana akan dikonfirmasi keberadaan antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO hasil induksi menggunakan reaksi spesifik antara antigen autoantibodi TPO dengan antibodi poliklonal anti-TPO yang dihasilkan. Hasil uji positif akan memberikan warna biru-keunguan.

Antibodi Anti-TPO hasil induksi Autoantibodi TPO pada kelinci							
Bleeding ke-	Pre imun	1	2	3	4	5	6
Pengenceran 1/200							

Gambar 4. Hasil Uji Dot Blot

Ket : Hasil deteksi dengan antibodi poliklonal terhadap autoantibodi TPO yang telah berlabel AP, mampu mengenali autoantibodi TPO yang terdapat pada serum pasien AITD.

Hasil Uji Dot Blot (Gambar 4) menunjukkan pada *bleeding* pertama setelah diinduksi dengan antigen autoantibodi TPO menunjukkan perubahan warna menjadi biru keunguan, yang menyatakan bahwa sistem imun tubuh kelinci memproduksi antibodi yang spesifik terhadap antigen autoantibodi TPO. Terjadi perbedaan intensitas warna pada *bleeding* pertama hingga *bleeding* keenam, dimana tingkat kepekatan warna semakin meningkat sejak *bleeding* pertama, kedua dan ketiga dan kemudian menurun kembali. Intensitas warna yang paling pekat dimiliki pada *bleeding* ketiga. Hal ini, menunjukkan bahwa pada serum hasil *bleeding* ketiga memiliki konsentrasi antibodi terhadap autoantibodi TPO tertinggi diantara yang lain. Terjadinya penurunan intensitas warna, disebabkan karena konsentrasi antigen dalam tubuh yang menurun sehingga produksi antibodi pun menjadi berkurang.

KESIMPULAN

Autoantibodi TPO hasil isolasi dari serum pasien AITD mempunyai berat molekul 51,1 kDa dan bersifat imunogenik. Antibodi poliklonal yang telah dilabel dengan enzim *Alkaline Phosphatase* mampu mengenali autoantibodi TPO pada serum pasien AITD dan memberikan hasil positif pada uji dengan Dot Blot.

UCAPAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari payung penelitian unggulan Perguruan Tinggi tahun 2012-2014 yang diketuai oleh Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Swain, M., Truptirekha S., and Binoy K. M., 2005, **Autoimmune Thyroid Disorders-An Update**, Indian J Clin Biochem. 2005 January; 20(1):9-17.
- [2] Ghoraishian, S.M., Moghaddam, S.H.H., and Ardekani, M.A., 2006, **Relationship between Anti-Thyroid Peroxidase Antibody and Thyroid Function Test**, Iran.J.Immunol. Vol. 3 No. 3 Summer 2006.
- [3] Guo, J., Rapoport, B., and Sandra M.M., 1997, **Thyroid Peroxidase Autoantibodies of IgE Class in Thyroid Autoimmunity**, J. Clin Immunopathol. 1997 Feb;82(2): 157-62.
- [4] Fiqriyana, M.A., Aulanni'am, Roosdiana, A., 2013, **Characterization of Polyclonal Antibody Induced by Autoantibody TPO (Thyroidperoxidase) From Autoimmune Thyroid Disease (AITD) Serum with ELISA and Western Blotting**, J. Pure App. Chem. Res., 2013, 2 (1), 19-26.
- [5] Rifa'I, M., 2010, **Autoimun dan Bioregulator**, Universitas Brawijaya Press (UB Press), Malang.